

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2013.02.005

· 基础研究 ·

VEGF 在溃疡性结肠炎癌变中的作用及其可能的机制

王柯^{1,2}, 王一^{2Δ}, 刘桂君³, 韩根成², 王仁喜², 肖鹤², 侯春梅², 彭晖², 沈倍奋², 黎燕², 陈国江²(1. 中南大学基础医学院免疫学系, 湖南长沙 410013; 2. 军事医学科学院基础医学研究所免疫学研究室, 北京 100850; 3. 内蒙古医科大学基础医学院分子生物学中心, 内蒙古呼和浩特 010059)

[摘要] **目的:**观察血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial cell growth factor, VEGF)信号对溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)癌变的影响并探讨其作用机制。**方法:**建立小鼠肠炎相关结肠直肠癌(colitis-associated colorectal cancer, CAC)模型, 用流式细胞术和 real-time PCR 分别检测模型小鼠外周血、脾脏、骨髓及瘤组织中髓样来源的抑制性细胞(myeloid-derived suppressor cell, MDSC)的比例和 MDSC 中精氨酸酶 1(arginase-1, *Arg-1*)和诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, *iNOS*)mRNA 的表达, ELISA 法检测结肠和 CAC 组织培养上清中 VEGF 的表达。以索拉菲尼(sorafenib)或 VEGF 单抗阻断 VEGF 信号后, 检测小鼠结肠和 CAC 部位 MDSC 比例的变化和病理改变。**结果:**成功建立小鼠 CAC 的模型, 并根据多项评价指标确定建模后 1 个月和 3 个月为 CAC 的早期和晚期。在 CAC 形成过程中, 小鼠体内 Gr-1⁺CD11b⁺MDSC 细胞数量明显增多, 病灶部位 MDSC 的积聚尤甚, 对照组为(0.30 ± 0.18)%、CAC 早期组为(1.32 ± 0.04)%、CAC 晚期组为(3.08 ± 0.29)% ($P < 0.05$)。这些 MDSC 细胞高表达 *Arg-1* 和 *iNOS* ($P < 0.05$), 但病灶部位 *L*-精氨酸含量显著降低[早期组为(4.22 ± 0.17) μg/ml、晚期组为(2.95 ± 1.08) μg/ml、对照组为(4.41 ± 0.16) μg/ml, $P < 0.05$]。此外, 与对照组相比, CAC 早期和晚期病灶组织高表达 VEGF [CAC 早期组为(1170 ± 94.43) pg/ml、晚期组为(1117 ± 71.92) pg/ml、对照组为(877.6 ± 31.67) pg/ml, $P < 0.05$]。索拉菲尼或 VEGF 抗体的治疗可显著抑制病灶部位 MDSC 的积聚。**结论:**VEGF 信号在 CAC 形成过程中发挥重要的促瘤功能, 其作用机制可能与诱导 MDSC 在病灶部位的聚集有关。

[关键词] 血管内皮细胞生长因子; 髓样来源的抑制性细胞; 溃疡性结肠炎; 肠炎相关结肠直肠癌; 索拉菲尼

[中图分类号] R735.3; R730.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2013)02-0159-07

Possible mechanism and effect of VEGF on the canceration of ulcerative colitis

Wang Ke^{1,2}, Wang Yi^{2Δ}, Liu Guijun³, Han Gencheng², Wang Renxi², Xiao He², Hou Chunmei², Pen Hui², Shen Beifen², Li Yan², Chen Guojiang²(1. Department of Immunology, School of Basic Medicine, Central South University, Changsha 410013, Hunan, China; 2. Immunology Laboratory, Institute of Basic Medical, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China; 3. Research Center of Molecular Biology, School of Basic Medicine, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010059, Inner Mongolia, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the role and mechanism of vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in the development of ulcerative colitis (UC)-related cancer. **Methods:** Colitis-associated colorectal cancer (CAC) model was established in Balb/c mice. The proportion of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) in the peripheral blood, spleen, bone marrow and tumor tissues of the model mice and lesions was examined by flow cytometry. Arginase-1 (*Arg-1*) mRNA and inducible nitric oxide synthase (*iNOS*) mRNA expressions in MDSCs were detected by qPCR. The VEGF expression in the supernatants of colonic tissues was determined by ELISA. Sorafenib or neutralizing anti-VEGF antibody

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973计划)资助项目(No. 2007CB512406); 国家自然科学基金资助项目(No. 30801029, No. 81272320)。Project supported by the National Key Basic Research and Development Project (973 Project) of China (No. 2007CB512406), and the National Natural Science Foundation of China (No. 30801029, No. 81272320)

[作者简介] 王柯(1986-), 男, 四川省雅安市人, 硕士生, 主要从事肿瘤微环境对免疫细胞调控机制的研究。E-mail: kingkeer@gmail.com
王一(1984-), 男, 吉林省吉林市人, 博士生, 研究工作同王柯。E-mail: yk091023@163.com。Δ为共同第一作者

[通信作者] 陈国江(Chen Guojiang, corresponding author), E-mail: guogangch@yahoo.com

[网络出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20130424.1310.005.html

was used to block VEGF signaling and the proportion of MDSC in colonic lesions and the histopathology of CAC were detected. **Results:** Murine CAC model was established successfully. 1 month and 3 months after the beginning of CAC were verified as the early and late stages of CAC respectively, according to several parameters. The increased number of Gr-1⁺ CD11b⁺ MDSC was observed in the progression of CAC and was more significant in lesions: control (0.30 ± 0.18)%, early stage of CAC (1.32 ± 0.04)%, late stage of CAC (3.08 ± 0.29)% ($P < 0.05$). These MDSCs expressed a high level of Arg-1 and iNOS ($P < 0.05$). But the levels of L-arginine in colonic lesions of CAC mice was much lower than controls (early stage of CAC [4.22 ± 0.17] μg/ml, late stage of CAC [2.95 ± 1.08] μg/ml, control [4.41 ± 0.16] μg/ml, $P < 0.05$). Furthermore, VEGF expression in the lesions of CAC mice was elevated significantly (early stage of CAC [1170 ± 94.43] pg/ml, late stage of [1117 ± 71.92] pg/ml, control [877.6 ± 31.67] pg/ml, $P < 0.05$). The treatment of sorafenib or anti-VEGF dramatically reduced accumulation of MDSC in the lesions. **Conclusion:** VEGF plays a pro-tumor role in CAC formation, which may be related with the induced accumulation of MDSC in colonic tissues.

[**Key words**] vascular endothelial cell growth factor; myeloid-derived suppressor cell; ulcerative colitis; colitis-associated colorectal cancer; sorafenib

[Chin J Cancer Biother, 2013, 20(2): 159-165]

髓样来源的抑制性细胞(myeloid-derived suppressor cell, MDSC)是肿瘤和其他多种病理条件下免疫抑制网络的主要成员,在肿瘤的发生、发展、逃逸过程中发挥重要作用。在小鼠中该细胞群共表达 Gr-1 和 CD11b。目前研究认为,MDSC 主要通过产生精氨酸酶 1(arginase-1, Arg-1)、诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)、一氧化氮(nitric oxide, NO)及活性氧族(reactive oxygen species, ROS)发挥免疫抑制功能^[1], MDSC 也可分泌一些炎症因子如血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial cell growth factor, VEGF)、金属基质蛋白酶 9(matrix metalloproteinase 9, MMP9)、转化生长因子(transforming growth factor-β, TGF-β)等来促进炎症及肿瘤的发展^[2,4]。近年来,随着对 MDSC 研究的深入,人们对 MDSC 的免疫抑制功能已经有较多的认识,目前人们将研究重点更多地转移到调控 MDSC 的产生和功能方面。MDSC 是在自身免疫病、感染、肿瘤等病理情况下髓系细胞分化发生异常时产生的,其产生和功能受到多条信号通路和细胞因子的影响^[5]。VEGF 是促进肿瘤生长和转移的重要因子,针对 VEGF-A 的单克隆抗体已经用于治疗转移性结直肠癌^[6]。有研究^[7]报道,VEGF 可刺激肠上皮细胞增殖,促进肿瘤细胞生长。然而 VEGF 在溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)癌变过程中的作用机理仍不甚清楚。本研究旨在观察在小鼠肠炎相关结直肠癌(colitis-associated colorectal cancer, CAC)模型中 VEGF 对 MDSC 产生的调控作用,并评价其对 CAC 形成的影响,为 UC 癌变的防治打下基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物和主要试剂

选取 80 只 6~8 周龄的 BALB/c 小鼠,由军事医学科学院实验动物中心提供,实验动物许可证号为 SCXK(军)—2007-004。氧化偶氮甲烷(azoxy-methane, AOM)购自 Sigma-Aldrich 公司,葡聚糖硫酸钠(dextran sulfate sodium, DSS)购自 MP Biomedical 公司, RPMI 1640 培养基购自 Hyclone 公司,索拉菲尼(sorafenib)购自 Bayer 公司, Percoll 分离液购自美国 Amersham 公司,胎牛血清购自北京元亨金马生物技术开发有限公司,胶原酶 D 购自美国 Roche Diagnostics 公司, TRIzol 溶液购自美国 Invitrogen 公司,逆转录试剂盒购自北京全式金生物技术公司,引物由北京天一辉远公司合成, PE-anti-Gr-1、FITC-anti-CD11b、APC-anti-VEGFR2 均为美国 eBioscience 产品, VEGF ELISA 检测试剂盒购自美国 R&D 公司,抗小鼠 VEGF-A 抗体购自美国 BioLegend 公司。CMF/FBS/EDTA 溶液自配, 500 ml 中含 45 ml 10 × HBSS、50 ml FBS、7.5 ml 1 mol/L HEPES、10 ml 0.25 mol/L EDTA,调 pH 值至 7.2,使用前 37 °C 水浴加热。

1.2 小鼠 CAC 模型与其治疗模型的建立

小鼠 CAC 模型建立参照文献[8-9]。将小鼠 30 只随机分为 CAC 模型组(20 只)和对照组(不做任何处理,10 只)。CAC 组小鼠在 -5 d 一次性腹腔注射 AOM(10 mg/kg),在 0 d 开始喂 2% DSS 水 1 周,随后自由饮水 2 周;2 轮喂 DSS 水后 CAC 早期模型建模结束,4 轮喂 DSS 水后 CAC 晚期模型建模结束(图 1)。根据小鼠结肠病理情况和该部位肿瘤检测指标将小鼠喂完 2 轮 DSS 水时(即 1 个月时)作为 CAC 早期,将小鼠喂完 4 轮 DSS 水时(即 3 个月时)作为 CAC 晚期。分别在 1 个月(CAC 早期)和 3 个

月(CAC 晚期)2 个时间点处死小鼠,进行后续相关实验。在该 CAC 模型的基础上选择早期模型小鼠,将其随机分为索拉菲尼治疗模型和 VEGF 抗体治疗模型。索拉菲尼治疗模型在 CAC 模型建立第 1 天起每天给小鼠口服灌胃索拉菲尼(40 mg/kg),每天 1 次,在建模 1 个月时处死小鼠,进行指标检测;VEGF 抗体治疗模型在 CAC 模型建立的第 1 天和第 14 天腹腔注射 VEGF 抗体,剂量为 200 mg/(只·次),在建模 1 个月时处死小鼠,进行指标检测。

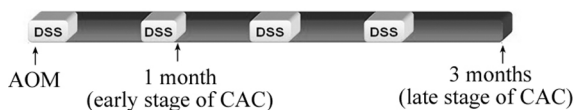


图 1 小鼠结肠炎相关结直肠癌模型的制备步骤

Fig. 1 Process of establishing a colitis-associated colorectal cancer mice model

1.3 H-E 染色观察小鼠结直肠组织的病理变化

颈椎脱臼法处死小鼠后,打开腹腔取出结肠,从结肠的近肛门端剪取 0.2~0.5 cm 结肠组织固定于 10% 的甲醛溶液中,石蜡包埋,切片,进行 H-E 染色,镜下观察拍片。

1.4 小鼠结肠组织离体培养

取近肛门端 1 cm 处结(直)肠,剪成约 0.5 cm² 小块,用无菌生理盐水清洗干净(洗 5~7 次),置 3 小块于 24 孔板中,加 2 ml 含青链霉素的无血清培养基,37 °C、5% CO₂ 条件下培养 24 h,收集上清,存于 -40 °C 备用。

1.5 酶消化法与 Percoll 密度梯度离心法制备结肠固有层细胞悬液

采用酶消化法消化结肠组织与 Percoll 密度梯度离心法结合获得结肠固有层细胞^[10]。首先将结肠纵向剪开,用生理盐水将结肠清洗干净,每组结肠(5 条/组)剪成 1~2 cm 的片段放入 150 ml 的锥形瓶中,加入 20 ml CMF/FBS/EDTA 溶液,于 37 °C 摇床(180 r/min),消化肠组织 5 次,每次 20 min;用 200 目筛网过滤去除上清,去除肠上皮细胞。将结肠组织放回锥形瓶中继续用含胶原酶(100 U/ml)的 RPMI 1640 培养基于摇床 37 °C 消化 3 次,每次用 20 ml 胶原酶溶液消化 1 h,用 200 目筛网过滤细胞悬液至 50 ml 离心管中。收集好细胞悬液后,850 × g 离心 10 min,弃上清,将每组细胞重悬于 4 ml 100% Percoll 溶液中,然后缓慢在液面上方铺上同体积的 40% Percoll 溶液,850 × g 室温离心 20 min,小心取出,可见液面中间有一层白膜层。用吸管将

白膜层细胞吸到新的试管中,加入大量生理盐水洗涤细胞,380 × g 离心 5 min,弃上清,获得结肠固有层细胞,将细胞重悬于培养基中。

1.6 流式细胞术检测结肠固有层中 MDSC 的比例

将获得的结肠固有层细胞用生理盐水洗涤 2 次,用 RPMI 1640 培养基重悬细胞并将细胞密度调至 1 × 10⁷/ml,每 1 ml 悬液各加入 2 μl Gr-1、CD11b、VEGFR2 抗体,冰上孵育 20 min,FACS 洗涤 2 次,4% 多聚甲醛固定,上流式细胞仪检测。用 WinMDI 2.8 软件分析各处理组中 Gr-1⁺ CD11b⁺ 细胞的比例和 Gr-1⁺ CD11b⁺ VEGFR2⁺ 细胞的比例。

1.7 Real-time PCR 检测小鼠结肠部位 MDSC 的 Arg-1 和 iNOS 的表达

TRIzol 法抽提结肠 MDSC 总 RNA,反转录为 cDNA。以 GAPDH 为内参,real-time PCR 检测各组 MDSC 中 Arg-1 和 iNOS 的表达。扩增条件:95 °C 3 min;95 °C 10 s,61 °C 15 s,72 °C 10 s,40 个循环;61 °C 30 s,共 69 个循环。各因子的扩增产物均以其相对应的 GAPDH 为基准校正,利用公式 2^{-ΔΔCT} 进行相对定量分析。

表 1 引物序列

Tab. 1 Primer sequence

Gene	Primer
<i>GAPDH</i>	
Forward	5'-TCTTGGGCTACTGAGGAC-3'
Reverse	5'-CATAACAGGAAATGAGCTTGA-3'
<i>Arg-1</i>	
Forward	5'-CTCCAAGCCAAAGTCCTTAGAG-3'
Reverse	5'-AGGAGCTGTCATTAGGGACATC-3'
<i>iNOS</i>	
Forward	5'-GTTCTCAGCCCAACAATACAAGA-3'
Reverse	5'-GTGGACGGGTCGATGTCAC-3'

1.8 高效液相色谱检测小鼠血清和结肠培养上清中 L-精氨酸的浓度

血清和结肠培养上清中的 L-精氨酸用高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)测定^[13]。取 100 μl 样本至 1.5 ml EP 管中,加入 100 μl 20% 三氯乙酸,颠倒混匀,上机检测。

1.9 ELISA 法检测小鼠结肠培养上清中 VEGF 的表达

留取各组小鼠的结肠组织培养上清(对照组、

CAC 早期组、CAC 晚期组), 采用双抗夹心法 ELISA 检测各组上清中的 VEGF 浓度。按照 VEGF ELISA 试剂盒操作要求依次加样; 肠培养上清每孔 $50 \mu\text{l}$, 37°C 孵育 30 min, 洗涤 5 次; 加酶标抗体后 37°C 孵育 30 min、洗涤 7 次, 37°C 显色 15 min, 终止反应、检测(450 nm 波长)光密度 D 值。每个标准品和样品的 D 值减去空白对照孔 D 值后代入标准曲线公式, 得到相应的 VEGF 质量浓度(pg/ml)。

1.10 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 PRISM 5.0 软件分析, 两组间比较采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠 CAC 模型的成功建立

本实验以 AOM 和 DSS 联用, 成功建立 CAC 模型, 3 个月时的发病率为 100%。观察结肠形态(图 2A)发现, CAC 早期结肠缩短, 中度水肿, 但未见明显肿瘤; CAC 晚期可见多个肿瘤, 集中于结直肠部位。计算肿瘤个数: CAC 晚期(3 个月)肿瘤数目明显多于 CAC 早期(1 个月) [(7.2 ± 0.79) vs (0.22 ± 0.15) 个, $P < 0.01$]。分析组织病理(图 2B): CAC 早期肠道可见上皮破坏, 溃疡形成, 炎性细胞浸润; CAC 晚期出现菜花样肿瘤向肠道内凸起。根据上述指标可将模型建立 1 月时定为 CAC 早期, 建模 3 月时定为 CAC 晚期, 为后期研究打下基础。

2.2 早期和晚期 CAC 病灶组织高表达 VEGF

ELISA 检测结肠组织离体培养上清中 VEGF 表达, 结果显示, 对照组小鼠结肠部位 VEGF 的含量为 (877.6 ± 31.67) pg/ml, CAC 早期组为 (1170 ± 94.43) pg/ml, CAC 晚期组为 (1117 ± 71.92) pg/ml, 与对照组相比, CAC 小鼠结肠部位 VEGF 的含量在 1 个月和 3 个月时均显著升高 ($P < 0.05$)。

2.3 早期和晚期 CAC 小鼠体内 MDSC 大量累积

观察小鼠 CAC 早期和晚期外周器官和病灶组织中 MDSC 的聚集情况, 结果(图 3)显示, CAC 早期组和晚期组病灶部位的 MDSC 均显著增多[对照组为 $(0.30 \pm 0.18)\%$, CAC 早期为 $(1.32 \pm 0.04)\%$, CAC 晚期为 $(3.08 \pm 0.29)\%$, 均 $P < 0.01$]。同时检测了 CAC 早期组和晚期组外周组织(外周血, 脾脏, 骨髓)中 MDSC 的比例, 结果(图 4)显示, 与对照组相比 CAC 早期组外周组织中的 MDSC 没有明显增加, 但晚期组均显著增加(均 $P < 0.01$); 外周血中晚期组为 $(49.43 \pm 7.75)\%$, 早期组为 $(29.96 \pm$

$4.99)\%$; 脾组织中晚期组为 $(9.95 \pm 3.53)\%$, 早期组为 $(3.14 \pm 0.41)\%$; 骨髓中晚期组为 $(60.73 \pm 8.24)\%$, 早期组为 $(48.87 \pm 2.12)\%$ 。

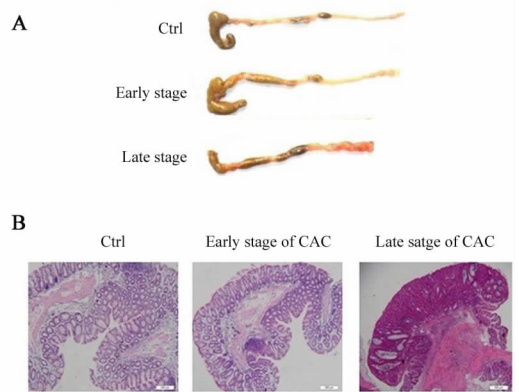


图 2 小鼠 CAC 模型的建立

Fig. 2 Establishment of colitis-associated colorectal cancer model

A: Macroscopic image of colons in each group;
B: Histopathology image of colons in each group(H-E staining, $\times 100$)

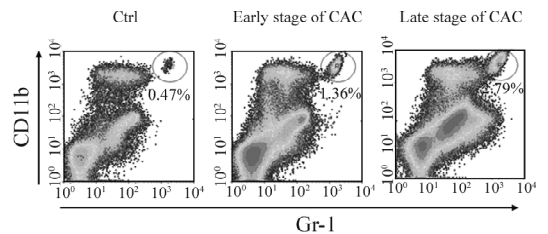


图 3 早期和晚期 CAC 小鼠结肠部位 MDSC 的比例

Fig. 3 Proportion of MDSC in mice colons at early stage and late stage of CAC

2.4 CAC 组小鼠结肠中 L -精氨酸含量明显降低且 MDSC 高表达 $Arg-1$ 和 $iNOS$

为进一步探究 MDSC 发挥免疫抑制功能的机制, 实验检测了血清和结肠组织培养上清中的 L -精氨酸含量。与对照组相比, CAC 早期组血清中的 L -精氨酸含量并无明显变化(结果未显示), 而此时 CAC 小鼠病灶组织中 L -精氨酸含量明显降低, 且 CAC 晚期组降低更为明显。早期组为 (4.22 ± 0.17) $\mu\text{g/ml}$, 晚期组为 (2.95 ± 1.08) $\mu\text{g/ml}$, 而对照组为 (4.41 ± 0.16) $\mu\text{g/ml}$ ($P < 0.05$)。

以 real-time PCR 技术检测了 CAC 早期组和晚期组结肠 MDSC 中 $Arg-1$ 和 $iNOS$ 的表达。结果(图 5A、B)显示, CAC 早期组结肠 MDSC 中 $Arg-1$ 相对表达量高于对照组 $(2.46 \pm 0.15$ vs 0.88 ± 0.07 , $P <$

0.05), *iNOS* 相对表达量高于对照组 (7.84 ± 0.76 vs 1.20 ± 0.25 , $P < 0.05$)。CAC 晚期组结肠 MDSC 中 *Arg-1* 相对表达量更高于对照组 (8.82 ± 0.60 vs 2.52 ± 0.31 , $P < 0.01$), *iNOS* 相对表达量也高于对照组 (10.55 ± 0.77 vs 1.24 ± 0.20 , $P < 0.01$)。 *Arg-1* 和 *iNOS* 在 CAC 结肠组织 MDSC 中均明显升高,提示 CAC 形成过程中结肠部位聚集了大量的 MDSC,这些细胞高表达 *Arg-1* 和 *iNOS*,降解体液中的 *L*-精氨酸,抑制效应 T 细胞的增殖。

($P < 0.05$);而且 MDSC 表面 VEGFR2 表达显著降低,AOM + DSS 组为($7\ 139 \pm 176.1$),AOM + DSS + sorafenib 组为($4\ 370 \pm 233.8$) ($P < 0.01$)。结果提示,VEGF 信号在 CAC 早期阶段 MDSC 的诱导和累积过程中发挥了重要作用,阻断 VEGF 信号能明显降低 MDSC 在病灶部位的累积,从而抑制结肠癌病情的发展。

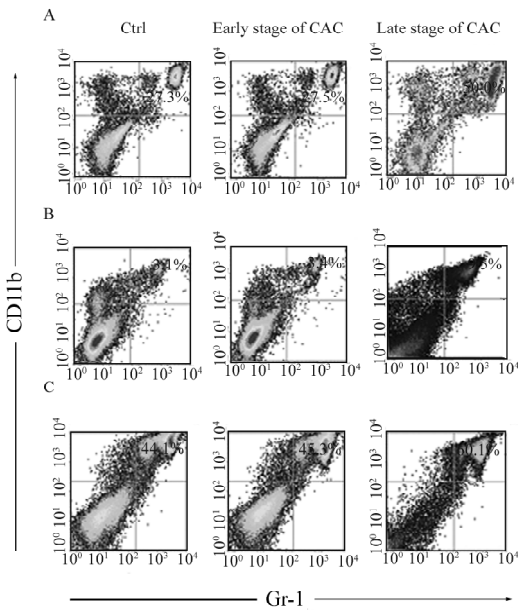


图 4 早期和晚期 CAC 小鼠外周血、脾脏和骨髓中 MDSC 的比例

Fig. 4 Proportions of MDSC in mice blood and bone marrow at early stage and late stage of CAC

A: Blood; B: Spleen; C: Bone marrow

2.5 索拉菲尼治疗可抑制结肠部位 MDSC 的累积和肠癌的发展

上述结果提示,VEGF 表达的升高与结肠部位 MDSC 的诱导累积存在明显的时空一致性,说明 VEGF 可能对 MDSC 在病灶部位的累积具有一定的作用。为验证这一假设,鉴于 VEGFR2 是酪氨酸酶受体之一,实验采用索拉菲尼阻断 VEGF 信号,观察其对结肠部位 MDSC 的累积和 CAC 进程的影响。结果(图 6A、B)显示,索拉菲尼治疗组小鼠结肠水肿明显减轻,肠上皮破坏受到抑制。与此相应,结肠组织中 MDSC 明显减少(图 6C),其中对照组为 (0.74 ± 0.17)%、AOM + DSS + sorafenib 组为 (0.56 ± 0.12)%、AOM + DSS 组为 (2.81 ± 0.39)%

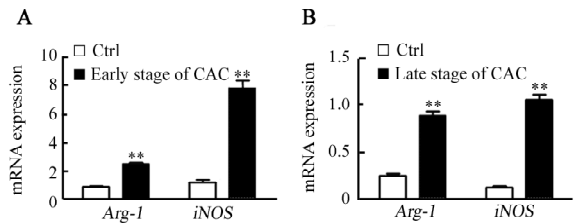


图 5 早期(A)和晚期(B)CAC 结肠组织 MDSC 中 *Arg-1* 和 *iNOS* mRNA 的相对表达量

Fig. 5 Relative expression levels of *Arg-1* mRNA and *iNOS* mRNA in colonic tissue MDSC at early(A) and late(B) stage of CAC

** $P < 0.01$ vs Ctrl

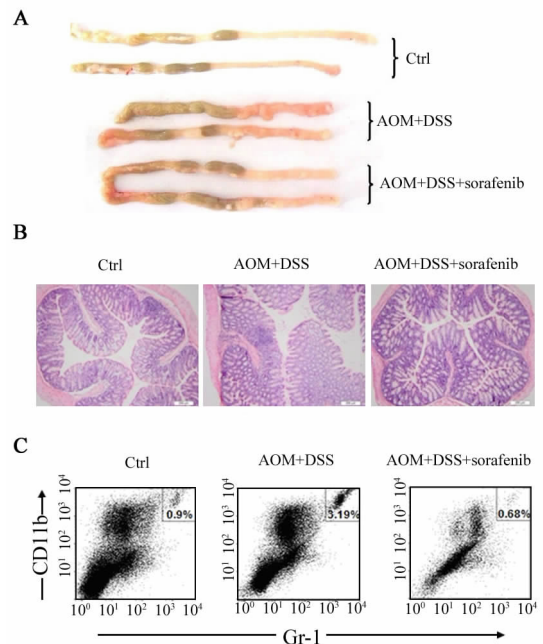


图 6 索拉菲尼治疗对 CAC 形成、结肠组织中 MDSC 的累积的影响

Fig. 6 Effects of sorafenib treatment on CAC formation, MDSC accumulation in colonic tissues

A: Macroscopic images of colon in each group;
B: Histopathology of colon in each group (H-E, $\times 100$);
C: The proportion of MDSC in colonic tissues with or without sorafenib treatment

2.6 VEGF 抗体治疗可抑制结肠 MDSC 的累积和肠癌的发展

鉴于索拉菲尼是一种非特异性 VEGF 信号阻断剂,为进一步明确 VEGF 在 MDSC 累积中的作用,实验用 VEGF 中和抗体在体内进一步验证 VEGF 的效应。结果(图7)显示,在 CAC 早期阶段用 VEGF 抗体治疗后,病理检查显示治疗效果明显(图7A);同时观察到结肠部位 MDSC 比例降低(图7B),对照组为 $(0.24 \pm 0.02)\%$ 、AOM + DSS + VEGFmAb 组为 $(2.09 \pm 0.05)\%$, AOM + DSS 组为 $(3 \pm 0.07)\%$ ($P < 0.01$)。结果再次表明,VEGF 信号对 MDSC 的诱导累积可能发挥着重要调控作用。

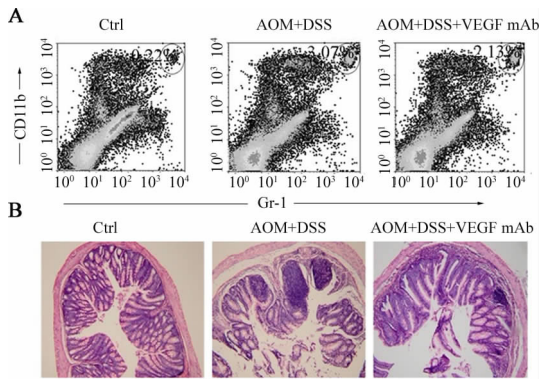


图7 VEGF 抗体治疗对 CAC 形成和 MDSC 累积的影响

Fig. 7 Effects of anti-VEGF antibody treatment on CAC formation and MDSC accumulation

A: The proportion of MDSC in colon tissues with or without anti-VEGF treatment; B: Histopathology of colons with or without anti-VEGF treatment (H-E, $\times 100$)

3 讨论

UC 是一种病因不明的慢性肠道炎症性疾病,具有病程长、易复发、迁延不愈等特点,严重影响患者的生活质量。近年来研究^[14]发现,随着疾病的迁延不愈和炎症的加重,并发结直肠癌的风险逐渐增加,UC 患者病程 10 年后的累计癌变率为 2%,20 年上升为 8%,30 年以上病史的 UC 患者患结直肠癌的风险高达 18%。在另一项对 UC 患者和正常人群的对照回顾性研究^[15]中发现,UC 的结直肠癌的发病率是非 UC 的发病率的 2~3 倍。尽管 CAC 只占整个人群中结直肠癌的 1%~2%,但它被认为是 UC 的严重并发症,据统计,约 15% 的 UC 患者死于癌症。因此,急需对 UC 诱发癌变的分子机制进行深入研究,筛选潜在靶点,开发特异高效的治疗药物。

VEGF 是维持实体瘤生长和转移的重要因子,

通过多种各种形式影响肿瘤的生长,VEGF 可促进肿瘤组织内微血管的形成,为肿瘤的生长提供养分^[16];也可直接刺激肿瘤细胞增殖,加速肿瘤的生长^[17],还可维持肿瘤干细胞集落,利于肿瘤干细胞生长等^[18]。有文献^[7]报道,在 CAC 的形成过程中,VEGF 通过刺激结肠上皮细胞增殖,加速其恶变,从而促进 CAC 的生长。本研究发现,诱导 MDSC 在病灶部位的产生和累积可能是 VEGF 促进肿瘤生长的又一重要机制。VEGF 很可能是 CAC 早期与 MDSC 诱导累积相关的重要因子之一,阻断 VEGF 信号显著减少了 MDSC 的产生和聚集,从而增强抗肿瘤免疫,抑制肿瘤的生长。然而 VEGF 调控 MDSC 产生和聚集的机制还有待进一步研究,此外阻断 VEGF 信号很可能也影响了其他促进肿瘤发展的因素,这些问题都值得更加深入的研究。另外,VEGF 的来源仍不甚清楚。在不同的病理环境中,多种细胞可分泌 VEGF,有意思的是 MDSC 也可分泌 VEGF,提示可能存在着 VEGF 自分泌调节机制^[19],这需要进一步的研究加以验证。

MDSC 可能通过多种机制影响机体的抗肿瘤免疫,其中 Arg-1 和 iNOS 是 MDSC 分泌的重要介质,Arg-1 通过分解体内的精氨酸,抑制 T 细胞的增殖,iNOS 在分解精氨酸的过程中可产生 NO^[20]。本实验结果显示,在 CAC 模型小鼠体内,MDSC 高表达 Arg-1 和 iNOS,与此同步的是病灶部位的 L-精氨酸含量显著降低。这些结果提示,MDSC 的作用机制部分是通过产生 Arg-1 和 iNOS 来抑制 CTL 的增殖和功能,从而抑制机体的抗肿瘤免疫反应,促进肿瘤的生长。

综上,本研究为诠释 VEGF 对 CAC 发生、发展的作用机制提供了新的思路:VEGF 通过影响 MDSC 的产生和累积,营造有利于 CAC 形成的微环境,促进 CAC 形成。因此,开发靶向 VEGF 的药物,如抗体或小分子化合物或抑制 MDSC 功能的药物可能是将来治疗 UC 和 CAC 的有效手段。

[参考文献]

- [1] Condamine T, Gabrilovich DI. Molecular mechanisms regulating myeloid-derived suppressor cell differentiation and function [J]. Trends Immunol, 2011, 32(1): 19-25.
- [2] Ellis LM, Hicklin DJ. VEGF-targeted therapy: Mechanisms of anti-tumour activity [J]. Nat Rev Cancer, 2008, 8(8): 579-591.
- [3] Ostrand-Rosenberg S, Sinha P. Myeloid-derived suppressor cells: Linking inflammation and cancer [J]. J Immunol, 2009, 182(8): 4499-4506.

- [4] Terabe M, Matsui S, Park JM, et al. Transforming growth factor-beta production and myeloid cells are an effector mechanism through which CD1d-restricted T cells block cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor immunosurveillance: Abrogation prevents tumor recurrence [J]. *J Exp Med*, 2003, 198(11): 1741-1752.
- [5] 王柯, 陈国江, 黎燕. 髓源抑制性细胞产生及其功能的分子调控机制 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2012, 19(3): 320-325.
- [6] Fuloria J. Safety profiles of current antiangiogenic therapies for metastatic colorectal cancer [J]. *Onco Targets Ther*, 2012, 5: 133-142.
- [7] Waldner MJ, Wirtz S, Jefremov A, et al. VEGF receptor signaling links inflammation and tumorigenesis in colitis-associated cancer [J]. *J Exp Med*, 2010, 207(13): 2855-2868.
- [8] Tanaka T, Kohno H, Suzuki R. et al. A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate [J]. *Cancer Sci*, 2003, 94(11): 965-973.
- [9] Suzuki R, Miyamoto S, Yasui Y, et al. Global gene expression analysis of the mouse colonic mucosa treated with azoxymethane and dextran sodium sulfate [J]. *BMC Cancer*, 2007, 7: 84-96.
- [10] Lefrancois L, Lycke N. Isolation of mouse small intestinal intraepithelial lymphocytes, Peyer's patch, and lamina propria cells [M]. *Curr Protoc Immunol*, 2001, Chapter 3: Unit 3.19.
- [11] Parish CR, Glidden MH, Quah BJ, et al. Use of the intracellular fluorescent dye CFSE to monitor lymphocyte migration and proliferation [J]. *Curr Protoc Immunol*, 2009, Chapter 4: Unit4.9.
- [12] Quah BJ, Parish CR. The use of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) to monitor lymphocyte proliferation [J]. *J Vis Exp*, 2010, 44: 2259-2262.
- [13] Marra M, Bonfigli AR, Testa R, et al. High-performance liquid chromatographic assay of asymmetric dimethylarginine, symmetric dimethylarginine, and arginine in human plasma by derivatization with naphthalene-2, 3-dicarboxaldehyde [J]. *Anal Biochem*, 2003, 318(1): 13-17.
- [14] Eaden JA, Mayberry JF, et al. Guidelines for screening and surveillance of asymptomatic colorectal cancer in patients with inflammatory bowel disease [J]. *Gut*, 2002, 51(Suppl 5): V10-V12.
- [15] van Staa TP, Card T, Logan RF, et al. 5-Aminosalicylate use and colorectal cancer risk in inflammatory bowel disease: A large epidemiological study [J]. *Gut*, 2005, 54(11): 1573-1578.
- [16] Carmeliet P. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer [J]. *Oncology*, 2005, 69(Suppl 3): 4-10.
- [17] Rapisarda A, Melillo G. Role of the VEGF/VEGFR axis in cancer biology and therapy [J]. *Adv Cancer Res*, 2012, 114: 237-267.
- [18] Beck B, Driessens G, Goossens S, et al. A vascular niche and a VEGF-Nrp1 loop regulate the initiation and stemness of skin tumours [J]. *Nature*, 2011, 478(7369): 399-403.
- [19] Donkor MK, Lahue E, Hoke TA, et al. Mammary tumor heterogeneity in the expansion of myeloid-derived suppressor cells [J]. *Int Immunopharmacol*, 2009, 9(7/8): 937-948.
- [20] Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system [J]. *Nat Rev Immunol*, 2009, 9(3): 162-174.
- [收稿日期] 2012 - 12 - 02 [修回日期] 2013 - 02 - 26
- [本文编辑] 王莹, 黄静怡

· 读者 · 作者 · 编者 ·

参考文献题名后须标注文献类型和文献载体标志代码

本刊参考文献按照国家标准 GB/T 7714-2005《文后参考文献著录规则》的要求进行著录。该国家标准要求,每条文献的题名后都须标上[文献类型标志]或[文献类型标志/文献载体标志]。对纸质文献,如为期刊中析出文献,题名后应标上[J];如为专著中析出文献,题名后应标上[M]。对电子文献,如为网络期刊析出文献,题名后须标上[J/OL];如为网络专著中析出文献,题名后须标上[M/OL]。

现将常用的文献类型标志代码和电子文献载体标志代码介绍如下:

表 1 文献类型和文献载体标志代码

文献类型	标志代码	文献类型	标志代码	载体类型	标志代码
期 刊	J	报 纸	N	磁 带	MT
专 著	M	专 利	P	磁 盘	DK
汇 编	G	标 准	S	光 盘	CD
会 议 录	C	数 据 库	DB	联 机 网 络	OL
学 位 论 文	D	计 算 机 程 序	CP		
报 告	R	电 子 公 告	EB		